

Convertible Microemulsion Formulations

Publication number: JP8504759 (T)

Publication date: 1996-05-21

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- **international:** A61K38/00; A61K38/04; A61K38/23; A61K38/25; A61K38/39; A61K9/107; A61K38/00; A61K38/04; A61K38/23; A61K38/25; A61K38/39; A61K9/107; (IPC1-7): A61K38/00; A61K9/107

- **European:** A61K38/04; A61K38/23; A61K38/25; A61K38/39; A61K9/107D

Application number: JP19940510324T 19931015

Priority number(s): WO1993US09933 19931015; US19920963326 19921016

Also published as:

WO9408604 (A1)

EP0746331 (A4)

EP0746331 (A1)

EP0746331 (B1)

DE69329430 (T2)

[more >>](#)

Abstract not available for JP 8504759 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9408604 (A1)**

There is provided a water-in-oil (w/o) microemulsion which readily converts to an oil-in-water (o/w) emulsion by the addition of aqueous fluid to the w/o microemulsion, whereby any water-soluble biologically-active material in the aqueous phase is released for absorption by the body. The w/o microemulsion contains a preferred high purity short chain monoglyceride surfactant. The w/o microemulsion is particularly useful for storing proteins and the like for long periods of time at room temperature and above until they are ready for use, at which time the addition of aqueous fluid converts the microemulsion to an o/w emulsion and releases the protein.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-504759

(43) 公表日 平成8年(1996)5月21日

(51) Int.Cl.⁶
A 61 K 9/107
38/00

識別記号 庁内整理番号
A 9455-4C
9455-4C

F I
A 61 K 37/02

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 53 頁)

(21) 出願番号 特願平6-510324
(36) (22) 出願日 平成5年(1993)10月15日
(35) 翻訳文提出日 平成7年(1995)4月17日
(36) 國際出願番号 PCT/US93/09933
(37) 國際公開番号 WO94/08604
(37) 國際公開日 平成6年(1994)4月28日
(31) 優先権主張番号 07/963, 326
(32) 優先日 1992年10月16日
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE), AU, CA, JP, US

(71) 出願人 アイビーエイエイチ・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国ペンシルバニア州19422,
ブルー・ベル, タウンシップ・ライン・ロード 512, フォー・ヴァレー・スクエア
一
(72) 発明者 オーエン, アルバート・ジェイ
アメリカ合衆国ペンシルバニア州19382,
ウエスト・チェスター, シャロン・サークル 827
(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 反転性マイクロエマルション組成物

(57) 【要約】

水性液を添加することによってo/wエマルションに容易に反転するw/oマイクロエマルションを提供する。この反転によって、水相中に存在する水溶性の生物学的活性物質が生体への吸収のために放出される。w/oマイクロエマルションは好ましい高純度の短鎖モノグリセリド界面活性剤を含む。w/oマイクロエマルションは、使用準備前に室温以上で蛋白などを長期間保存するのに特に有用である。使用時には、水性液を添加してマイクロエマルションをo/wエマルションに反転して蛋白を放出させる。

【特許請求の範囲】

1.

(a) 1 以上の薬剤学的に受容しうる油を含む油相、約 5 - 約 99 容量%

(b) 水を含む水相、約 60 容量% 以下

(c) 水 : 油の分配係数が 10 : 1 より大きい生物学的活性物質

(d) (i) 低 HLB 界面活性剤またはその混合物（ここにおいて、当該低 HLB 界面活性剤の HLB は 8 未満であり、少なくとも 1 つの低 HLB 界面活性剤は 80 重量% 以上の C₉ モノグリセリド、C₁₀ モノグリセリド、C₁₁ モノグリセリド、C₁₂ モノグリセリド、C₁₃ モノグリセリドまたはこれらの混合物である）、および

(ii) HLB が約 8 より大きい 1 以上の界面活性剤

を含む混合後の HLB が約 7 - 約 14 の界面活性剤混合物、約 1 - 約 70 容量% を含む、保存に適し、生物学的活性材料の投与に適した、安定な油中水マイクロエマルション。

2. 活性物質が治療活性物質であって、蛋白またはペプチドである請求項 1 の油中水マイクロエマルション。

3. 少なくとも 1 つの低 HLB 界面活性剤が 80 重量% 以上の C₁₁ モノグリセリド、C₁₃ モノグリセリドまたはこれらの混合物を含む請求項 2 の油中水マイクロエマルション。

4. 少なくとも 1 つの低 HLB 界面活性剤が前記モノグリセリドを 90 重量% 以上含む請求項 3 の油中水マイクロエマルション。

5. 少なくとも 1 つの低 HLB 界面活性剤が前記モノグリセリドを 95 重量% 以上含む請求項 3 の油中水マイクロエマルション。

6. 油相が C₉₋₁₅ トリグリセリド、C₇₋₅₅ のプロピレングリコールのジエステル およびこれらの混合物を含む請求項 3 の油中水マイクロエマルション。

7. 低 HLB 界面活性剤またはその混合物が 80 重量% 以上の C₁₁ モノグリセリド、C₁₃ モノグリセリドまたはこれらの混合物を含む請求項 2 の油中水マイクロ

エマルション。

8. 組成物が約23℃で固体である請求項1、2、3、4、5、6および7のいずれかの油中水マイクロエマルション。

9. 組成物が約23℃で液体である請求項1、2、3、4、5、6および7のいずれかの油中水マイクロエマルション。

10.

(a) 1以上の薬剤学的に受容しうる油を含む油相、約5-約99容量%

(b) 水を含む水相、約60容量%以下

(c) 水：油の分配係数が10：1より大きい生物学的活性物質

(d) (i) 低HLB界面活性剤またはその混合物（ここにおいて、当該低HLB界面活性剤のHLBは8未満であり、少なくとも1つの低HLB界面活性剤は80重量%以上のC₉モノグリセリド、C₁₀モノグリセリド、C₁₁モノグリセリド、C₁₂モノグリセリド、C₁₃モノグリセリドまたはこれらの混合物である）、および

(ii) HLBが約8より大きい1以上の界面活性剤

を含む混合後のHLBが約7より大きい界面活性剤混合物、約1-約70容量%

(e) 水性液の添加により油中水マイクロエマルションを水中油マイクロエマルジョンに反転するのに十分な量の改質剤

を含む、保存に適し、生物学的活性材料の投与に適した、安定な油中水マイクロエマルション。

11. 改質剤がソルビトール、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、マンニトール、二糖類またはこれらの混合物を含む請求項10の油中水マイクロエマルション。

12. 活性物質が治療活性物質であって、蛋白またはペプチドである請求項11の油中水マイクロエマルション。

13. 少なくとも1つの低HLB界面活性剤が80重量%以上のC₁₁モノグリセリド、C₁₃モノグリセリドまたはこれらの混合物を含む請求項12の油中水マイ

クロエマルション。

14. 少なくとも1つの低HLB界面活性剤またはその混合物が80重量%以上

のC₁₁モノグリセリド、C₁₃モノグリセリドまたはこれらの混合物である請求項12の油中水マイクロエマルション。

15. 組成物が約23℃で固体である請求項10、11、12、13および14のいずれかの油中水マイクロエマルション。

16. 組成物が約23℃で液体である請求項10、11、12、13および14のいずれかの油中水マイクロエマルション。

17.

(a) (1) 1以上の薬剤学的に受容しうる油を含む油相、約5—約99容量%

(2) 水を含む水相、約60容量%以下

(3) 水：油の分配係数が10：1より大きい生物学的活性物質

(4) (i) 低HLB界面活性剤またはその混合物（ここにおいて、当該低HLB界面活性剤のHLBは8未満であり、少なくとも1つの低HLB界面活性剤は80重量%以上のC₉モノグリセリド、C₁₀モノグリセリド、C₁₁モノグリセリド、C₁₂モノグリセリド、C₁₃モノグリセリドまたはこれらの混合物である）、および

(ii) HLBが約8より大きい1以上の界面活性剤

を含む混合後のHLBが約7—約14の界面活性剤混合物、約1—約70容量%を含む油中水マイクロエマルションを調製し、

(b) 効果量の油中水マイクロエマルションを非経口的、腸内またはその他の粘膜経由で動物の体に投与する

ことからなる油中水マイクロエマルションを動物に投与する方法。

18. 活性物質が蛋白質またはペプチドである請求項17の方法。

19. 投与が経口的である請求項18の方法。

20. 投与が直腸への投与である請求項18の方法。

【発明の詳細な説明】**反転性マイクロエマルション組成物****本発明の分野**

本願は、現在放棄されている1991年4月19日に出願された米国出願第687,691号；に基づく一部継続出願である1992年2月14日に出願された米国出願第837,347号；に基づく一部継続出願である1992年2月25日に出願された米国出願第841,931号；に基づく一部継続出願である1992年4月15日に出願された一部継続出願であるPCT\US92\03086号；に基づく継続出願である1992年5月20日に出願された一部継続出願である米国出願第855,202号；に基づく一部継続出願である1992年10月16日に出願された一部継続出願である。

本発明は、マイクロエマルション、その製造方法およびその使用方法に関する。より詳細には、本発明は相可逆性（すなわち、以下で定義する「反転性」）の特徴的なマイクロエマルション組成物、その製造保存方法、および薬剤や蛋白などの治療活性物質を含む生物学的活性物質の投与への使用に関する。

本発明のマイクロエマルションは、界面活性分子の界面膜によって安定化されている、自己乳化している油と水の安定な分散液である。本発明のマイクロエマルションは、その平均粒径が概して約0.1ミクロン未満で小さく、その安定温度幅が概して約5-50°Cで広く、この温度範囲でいつまでも安定であって熱力学的安定性がある点に特徴がある。また、本発明のマイクロエマルションは、その水相のpHやイオン強度の影響を比較的受けにくい。

さらに本発明のマイクロエマルションは、従来のエマルション（マクロエマルション）と異なり高剪断装置を必要とせずに自発的に形成される点にも特徴がある。従来のエマルションは、その形成にかなり大きなエネルギーが必要とされており、厳しい温度、圧力、剪断条件を経なければならなかった。このため、結果としてエマルションの成分が損なわれていた。この系に関しては、「マクロエマルションズ」，M. Kahleweit, Science, 240:617-621(1988)にさらに詳しく論じられているので参照されたい。

本明細書において本発明のマイクロエマルションを記述するのに用いられている「反転性（c o n v e r t i b l e）」または「相可逆性（p h a s e r e v e r s i b l e）」という用語は、以下に詳述するように水を添加することによって油中水系（w／o）から水中油系（o／w）に変化することができるマイクロエマルション組成物を意味する。

また、本明細書において「反転（c o n v e r s i o n）」という用語は、特にw／oエマルションを逆にo／wエマルションにすることを意味する。反転は、本技術分野において用いられている「転化（i n v e r s i o n）」とは異なる。転化は、基本的にw／oエマルションを水中油中水系（w／o／w）にすることを意味する。

発明の背景

マイクロエマルションの形成やマイクロエマルションを薬剤、蛋白などの形成に用いることは従来より知られている。例えば、米国特許第3, 989, 843号明細書にはマイクロエマルションを医療用組成物に適用することが開示されている。また、E u r . J . B i o c h e m . , S a m a m a r a , 1 6 3 (3) : 6 0 9 - 6 1 7 (1 9 8 7 年 3 月 1 6 日) には、イオン性w／oエマルション中の肝臓アルコール脱水素酵素が記載されている。また、L e e らは F E B S L e t t . , 2 4 4 (2) : 3 4 7 - 5 0 (1 9 8 9 年 2 月 2 7 日) において種々のイオン性マイクロエマルションを用いたエポキシドサイクラーの抽出について記載している。しかしながら、以上の文献には、これらのマイクロエマルションが相可逆性であることについて教示も示唆もしていない。

一方、米国特許第4, 931, 210号、第4, 857, 506号、第4, 714, 566号および第4, 590, 086号明細書には、w／oエポキシドサイクラーの形成方法およびこれを周知の水中油中水相（w／o／w）エマルションに転化することが開示されている。しかし、これらの複雑な組成物を形成するには高剪断エネルギーが必要である。また、形成される製造物はw／o／wエマルションであり、最初の内部水相が第二の連続水相と混合しないように水相に混ぜられたw／oエマルションを実際に含んでいる。

経口、非経口または局所的皮膚投与により親油性物質を供給し、ポリペプチドヒルジンを皮膚を通して供給するためのエマルション系が、Muellerらの米国特許第4,719,239号明細書に開示されている。良好な親水性／親油性バランスを有する薬剤を含有する皮膚浸透用マイクロエマルション系が、英国出願第2,098,865号明細書に開示されている。しかしながら、これらの文献にはw/oマイクロエマルションを蛋白やペプチドなどの水溶性活性剤を粘膜へ供給するために用いることは開示されていない。

マイクロエマルション系を注射剤として使用することについては、英国特許第1,171,125号に記載されている。開示されている組成物は生物学的活性物質の吸収を高めることを目的とするものではなく、またモノグリセリドを界面活性剤として用いることも示されていない。

エマルション、特にw/oエマルションは、ワクチンアジュバントとしても用いられる。免疫応答の強さや免疫応答を誘発する速度は、ワクチンの液体マトリックスの性質によって調節することができる。そのような系として広く用いられているものの中に、フロイントアジュバントがある。フロイントアジュバントは、パラフィン油と界面活性剤たるマンニットモノオレイン酸エステルからなる。このようなアジュバントエマルションは熱力学的安定性に欠けるため、ワクチン注射直前に免疫原を含む溶液を用いて乳化しなければならない。また、アジュバント中のパラフィン油が注射部位の炎症を招いたり、肉芽腫の形成を引き起こすこともある。このような2つの悪影響は、免疫刺激物を用いた場合にはかなり増大する。しかし、油や免疫刺激物はマクロファージの活性を高めて免疫応答を刺激する点で有用である。マクロファージはエマルション滴を取り込み、注射部位に免疫源を産生する。このため、調製されたマイクロエマルション状態で長時間安定に保存することができ、かつ肉芽腫の形成を誘発しないであろう生分解性油を用いて調製しうるワクチンアジュバント系を形成しうる点で有用である。

生物学的活性物質の新しくて優れた供給系を開発することが依然として必要とされている。バイオテクノロジーの進歩により生み出された多くの治療剤や、インシュリンやカルシトニンなどの従来から知られている薬物のいくつかは、大き

な分子の蛋白からなる。これらの薬物は消化工程後も残存することはなく、胃腸管の粘膜ライニングを容易に通過して血流中に入ってしまうため、薬物は患者に注射しなければならなかつた。このため、例えば消化系のライニングを通つて血流に入る新しい薬物供給系があれば大変有益である。

優れた薬物供給系は、患者にとってもまた大変有益なものであろう。例えば、カルシトニンは骨粗鬆症や骨損失などの疾患治療用の一般的なペプチドホルモンであるが、骨粗鬆症は2400万のアメリカ人を冒しており、女性の既往月経閉鎖の2/3を含んでいる。現在、カルシトニンはほとんどの場合に注射により投与されている。カルシトニンによる骨粗鬆症の治療は、低濃度で頻繁に長期間投与することが必要とされる。このため、治療が必要とされる患者にとっては、カルシトニンが経口剤または座剤として提供されることが非常に好ましい。

発明の要約

本発明によって、生物学的に（治療的を含む）活性な水溶性物質を内部水相中に含む非常に安定なw/oマイクロエマルションを含有する組成物が提供される。水溶性物質は、投与直前の必要時に水を添加することによってマイクロエマルションをo/wエマルションに反転させることにより、制御下に放出される。

本発明は、このようなマイクロエマルションの製造や、マイクロエマルションを生物学的および治療的に活性な水溶性物質の投与に用いることにも関係する。

本発明の一実施態様として、(i) 1以上の薬剤学的に許容しうる油を含む油相、(ii) 水を含む水相、(iii) 生物学的活性物質、および(iv) 混合後のHLBが約7-約14の界面活性剤混合物を含むw/oマイクロエマルションを挙げることができる。界面活性剤混合物は、HLBが約8未満の1以上の界面活性剤、すなわち低HLB界面活性剤を含む。低HLB界面活性剤は、C₉、C₁₀、C₁₁、C₁₂またはC₁₃モノグリセリドまたはこれらの混合物を80重量%以上、好ましくは90重量%以上、さらに好ましくは95重量%以上含有する。界面活性剤混合物は、HLBが約8を越える1以上の界面活性剤、すなわち高HLB界面活性剤をも含む。低HLB界面活性剤と高HLB界面活性剤は異なる界面活性剤の混合物であつてもよい。好ましい低HLB界面活性剤は、C₉、C₁₁、C₁₃モノグ

リセリドまたはこれらの混合物を含有するものであり、C₁₁またはC₁₃モノグリセリドまたはこれらの混合物を含むものであればより好ましい。

本発明の一面は、蛋白やペプチドなどの物質を溶解状態にして、溶解状態になければ不安定な温度や条件において保存・維持することにある。例えば、ある種の蛋白はw/oエマルションの水相に溶解することにより、単なる水溶液として保存したら不安定な温度でも保存しうることが確認されている。このような蛋白は本発明のw/oエマルション中で使用時まで保存し、使用時に水を加えてo/wエマルションを形成し、これを経口的または注射により投与することができる。また、保存したw/oエマルションを生体に投与して、生体内で体液の作用によりo/wエマルションに反転させることもできる。この場合には、保存問題は軽減されるか、全くないことになる。

本発明の組成物を用いて達成することができる蛋白などの薬物の典型的な保存時間は、ほぼ室温（すなわち約20℃）からマイクロエマルション崩壊温度（一般的には約50-70度、好ましくは約40度未満）において、約1-48時間、好ましくは16-24時間から、数週間（すなわち3-12週間または月）の間のいずれかである。約4℃といったような室温以下の温度でも、使用することができる。

本発明のさらに別の側面において、予期せぬことに、例えば内部水相中に水溶性薬物を含有する本発明のw/oマイクロエマルションをヒトを含む哺乳類の生体に直接投与すると、体液そのものがw/oエマルションをo/wエマルションに反転するのに十分な作用をし、その結果薬物がその場でゆっくりと放出されることが確認されている。この方法は体液を用いているため投与すべき液体の総容積が少なくて済む。したがって、あらかじめ水で反転させておく場合に比べると特に有利である。また、この方法は、ペプチド、蛋白などの酵素によって容易に攻撃される結合を有する分子からなる薬物を結腸または腸に投与する最も特に有用である。この際、体液がエマルションを反転させることにより放出されるまで、薬物は腸において油により保護されている。例えば、カルシトニンの場合は、水溶液として結腸に投与すると結腸に存在する酵素がカルシトニンを吸収前に分

解してしまう。しかしながら、本発明のマイクロエマルションにしておけば、カルシトニンは体液による水和によりゆっくりと放出されるまでは酵素から保護されている。

本発明の特別な態様においては、添加した水で反転させることにより〇／wエマルションが形成するようにw／〇マイクロエマルションを組成する。この系は、反転系が小さな粒径を有する点に利点がある。本発明の他の態様においては、マイクロエマルションを室温で固体として組成する。このマイクロエマルションは驚くべきことに胃腸供給用薬物の取り込みと活性を増大させることが確認されている。

本発明の特別な態様においては、w／〇マイクロエマルションはワクチンアジュバントとして使用する。免疫源はマイクロエマルションアジュバントの水相中で運ばれ、生体中に導入されて水性体液と接触することにより〇／wエマルションに反転する。

本明細書において「生体への投与」は、いずれの態様であってもよい。マイクロエマルションへ反転する系は、非経口、腸内、その他の粘膜を通して投与されるのが好ましく、経口、直腸または竇内へ投与されるのがより好ましい。マイクロエマルションへ反転する系は、マクロエマルションに反転する系の場合と同様にして投与するが、静脈内または動脈内に投与するのも好ましい。

本発明のさらに他の態様において、w／〇マイクロエマルションは局所投与用軟膏を調製するために使用することもできる。この軟膏は乾燥したり粒団を形成したりすることなく長時間皮膚上で湿った状態で存在する点でかなり有効である。

図面の簡単な説明

図1は、低HLB界面活性剤としてCapte_x200およびImwitor308を含み、高HLB界面活性剤としてTween80を含む油相と、生理食塩水の水相を用いた様々なマイクロエマルションを示す状態図である。

図2は、低HLB界面活性剤としてCapte_x800およびImwitor308を含み、高HLB界面活性剤としてTween80を含む油相と、生理食塩水の水相を用いた様々なマイクロエマルションを示す状態図である。

図3は、低HLB界面活性剤としてCapte_x200およびImwitor308を含み、高HLB界面活性剤としてグルカーメットSSE-20を含む油相と、生理食塩水の水相を用いた様々なマイクロエマルションを示す状態図である。

図4は、低HLB界面活性剤としてCapte_x200およびImwitor308を含み、高HLB界面活性剤としてBrrij30を含む油相と、生理食塩水の水相を用いた様々なマイクロエマルションを示す状態図である。

図5は、低HLB界面活性剤としてWitepsolH-15、Capte_x800およびImwitor308を含み、高HLB界面活性剤としてTween80を含む油相と、生理食塩水の水相を用いた約23℃で固体の様々なマイクロエマルションを示す状態図である。

発明の記述

水溶性の生物学的活性物質を含むw/oマイクロエマルションの製造および使用については、本出願の譲受人に譲渡された同時係属中の1992年5月20日出願の米国出願第885,202号に記載されている。この米国出願の全文は本明細書の一部として引用する。高純度のC₉₋₁₃モノグリセリドを低HLB（親水性-親油性バランス）界面活性剤として使用することにより、投与後の活性物質の取り込み量が増すことが驚くべき事実として見いだされている。

本発明のw/oマイクロエマルションは、水性液を添加することによってo/wエマルションに反転しうる。本発明のマイクロエマルションは、(1)1以上の薬剤学的に受容しうる油を含む油相、(2)水を含む水相、(3)1以上の生物学的活性物質、および(4)(i)低HLB界面活性剤、すなわちHLBが約8未満の1以上の界面活性剤と(ii)高HLB界面活性剤、すなわちHLBが約8より大きい1以上の界面活性剤を含む混合後のHLBが概して約7-約14の界面活性剤混合物を混合することによって調製される。低HLB界面活性剤は、C₉、C₁₀、C₁₁、C₁₂またはC₁₃モノグリセリドまたはこれらの混合物を80重量%以上、好ましくは約90重量%以上、さらに好ましくは約95重量%以上含有する。これらのモノグリセリドは3炭素のグリセリド骨格上に結合した炭素数6-10の脂肪酸部分を有し、C₆₋₁₀脂肪酸モノグリセリドと表記されること

もある。

また、安定剤、着色剤、油溶性薬物などの他のアジュバントをw/oマイクロエマルションに含ませてもよい。これらの成分とアジュバントのそれぞれは、本主題における用途に適したものでなければならない。通常は、食品級および/または薬剤学的に許容しうる物質であるだろう。薬剤はいかなるものでも治療効果量存在させうる。本発明の組成物は生物学的に適応するw/oマイクロエマルションである。本発明の組成物は、毒性がなくて生分解性または非吸収性物質からなる点で生物学的な適用性がある。毒性がないということは、被投与体に対してある特定の経路で投与した場合に毒性がないことを意味している。ある経路で投与した場合の毒性は、他の経路で投与した場合の毒性と等しいとは限らないのである。

本発明のマイクロエマルションは、界面活性剤または界面活性剤の混合物と油および水相の間の相互作用によって形成される。界面活性剤または界面活性剤の混合物は、ある特定のHLBを有している。HLB (hydrophilic-lipophilic balance) は、任意目盛りに基づく実験的な量であり、界面活性剤または界面活性剤の混合物の極性の尺度である。P. Becherらの「Nonionic Surfactant, Physical Chemistry」Marcel Dekker, NY (1987) 439-456頁を参照されたい。HLBは広く知られ、用いられている用語である。w/oマイクロエマルションは、室温において固体（半固体、ゲルも含む）または液体である。

より詳細には、生物学的活性物質が水相の体積に基づいて 10^{-9} から 100 重量/容量%含まれるように成分量を調節する。マイクロエマルション中には、約60容量%以下の水相と、約5-約99容量%、好ましくは約10-約99容量%の油相と、約1-約70容量%の界面活性剤からなるのが一般的である。

w/oエマルション中の水の量は、約20容量%以下、好ましくは約30容量%以下、より好ましくは約40容量%以下であり、マイクロエマルションの60容量%も含まれることもある。好ましい高水相成分のw/oエマルションにおい

ては、水相成分が約20-約60容量%、好ましくは約30-約60容量%、最も好ましくは約40-50容量%含まれ、油成分が約5-約60容量%、好ましくは約10-約50容量%、最も好ましくは約15-40%含まれる。界面活性剤成分には、低HLB界面活性剤が約5-約30容量%、好ましくは約5-約25容量%、より好ましくは約5-約20容量%含まれ、高HLB界面活性剤が約5-約30容量%、好ましくは約5-約25容量%、より好ましくは約10-約25容量%含まれる。

好ましい低水相成分のw/oマイクロエマルションにおいては、水相が約20%未満、好ましくは約0.1-約20%、最も好ましくは約0.1-15容量%含まれ、油成分は約35-約90容積%、好ましくは約45-90%含まれる。界面活性剤成分には、低HLB界面活性剤が約5-約25容量%、好ましくは約10-25%含まれ、高HLB界面活性剤が約1-約20容量%、好ましくは約1-15%含まれる。w/oエマルションの水相が約20容量%未満である場合は、油相と低HLB界面活性剤の比は通常1:1以上、好ましくは1:1-約1.5:1、最も好ましくは約2:1-約1.0:1であり、場合によっては約2:1-約5:1になる。

水相の水成分は、少なくとも2つのヒドロキシ基を有する多価アルコール、グリセロール、プロピレングリコールやこれらの混合物などの水以外の生物適用性の極性溶媒で部分的に代用することができる。しかし、水相は概して40容量%、好ましくは60容量%、より好ましくは75容量%以上の水を含む。本明細書において「水相」という用語には、水やこれに類する極性溶媒やこれらの混合物を含む相が包含される。水相には水（または他の極性溶媒）や活性物質の外に、安定化剤、着色剤、改質剤など（これらの例に限定されない）のアジュバントや塩（例えば生理食塩水が用いられる）を含ませることができる。

高水相成分を含有するマイクロエマルションは、生物学的活性物質の水溶性が比較的低い場合や、マイクロエマルション中に比較的多量の生物学的活性物質が必要とされる場合に好ましい。

保存料、着色剤、芳香剤などのアジュバントか、ステロイドなどの油溶性薬物

があるならば、これらはマイクロエマルションの新しい性質に悪影響を与えない量で含ませる。一般に、マイクロエマルションの総容積の20%未満である。

以下の記載において、油や界面活性剤の性質は下記の個々の条件に対して臨界的でなく、食品や製薬業界で受け入れられ通常用いられている既知の物質のいずれもが一般に使用しうることが理解されるであろう。油や界面活性剤は、特定の投与形態または意図する投与形態において安全に用いられることが当業者に自明であることから、「薬剤学的に受容しうる」ものであると考えられている。例えば、プロピレングリコールジエステル類などの油は経口投与に際し安全であり、トリグリセリドなどの油は静脈投与に際し安全である。

油や油の混合物は室温において液体であってもよく、またある様では固体油を穏やかに加熱することによって液体になるものであってもよい。注射が投与の好ましい形態である場合は、油は室温で液体のものを用いるべきである。室温で固体の油の加熱は、座薬、クリーム、軟膏、ある場合には経口用カプセルとしてマイクロエマルションを用いたい場合に望ましい。

本発明の目的にかなう適当な油として、炭素数約9-83、好ましくは21-60、より好ましくは21-45のグリセロールのトリエステルを挙げることができる。トリグリセリドは、炭素数9-15の短鎖トリグリセリド、炭素数21-45の中鎖トリグリセリド、炭素数が45より多い長鎖トリグリセリドに分類される。短鎖トリグリセリドと中鎖トリグリセリドは、液体w/oマイクロエマルションに好適である。グリセロールトリエステルとして、キャノーラ、コーン、オリーブ、サンフラワーややし油などの天然食用油、トリアセチン、デカン酸エステル、1-オレイル-2,3-ジアセチルグリセロールなどの化学的に合成された油を挙げができる。商業的に入手しうるトリグリセリド油、天然油および化学的に合成された油は、Karlshamns Lipid Specialties(米国)からCapte^x™シリーズとして、Hul's American Inc.からMiglyolシリーズとして入手することができる。

この他の適当な油として、炭素数約7-55、好ましくは15-40のプロピレングリコールのジエステル、より好ましくは炭素数19-23のカプリン酸と

カプリル酸のプロピレングリコールエステルおよびこれらの混合物を例示することができる。プロピレングリコールのジエステルは、炭素数7-11の短鎖物、炭素数15-31の中鎖物、炭素数が31より多い長鎖物にさらに分類される。プロピレングリコールのジエステルとして、CapteTM 200、CapteTM 800 (Karlshamn's Lipid Specialties, コロンブス, オハイオ)などのカプリリン酸、カプリル酸およびこれらの混合物のプロピレングリコールエステルや、グリセロールの説明の際に例示したエステル基を挙げることができる。

界面活性剤、より好ましくは界面活性剤の混合物は、混合後のHLBが約7-14、好ましくは8-13になるものの中から選択する。界面活性剤の混合物を用いた場合は、成分の一部は所望のHLB域から外れていてもよい。例えばHLBが約5以下の界面活性剤を用いた場合は、例えばHLBが約9以上の界面活性剤と混合すれば、混合後のHLBは7-14の範囲内になることが理解されるであろう。一部の蛋白やペプチド供給系は、ステロールやレシチンといったある種の界面活性剤の存在を必要とするが、w/oマイクロエマルションはこのような界面活性剤や界面活性剤の混合物の存在を要しない。だが、このような界面活性剤を単独または組み合わせて本発明で使用することもできる。w/oマイクロエマルションの低HLB界面活性剤部分中のモノグリセリドに対する要求があるにも拘わらず、列挙した界面活性剤を約0.05重量%未満の実質的に界面活性剤を含まないマイクロエマルションにすることができる。

本発明で使用しうる界面活性剤として、両イオン剤、すなわちカチオン界面活性剤、アニオン界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン界面活性剤やこれらの混合物を挙げることができる。カチオン界面活性剤として、臭化セチルジメチルエチルアンモニウム、塩化セチルピリジニウム、これらの界面活性剤の他の塩を挙げることができる。

アニオン界面活性剤として、C₈₋₃₂の脂肪酸およびその塩；デオキシコール酸エステルやその塩、ウルソデオキシコール酸、タウロコール酸などのコール酸とその誘導体；C₈₋₅₆の酒石酸ジエステル；ホスファチド酸、ホスファチジルセリ

ンなどのリン脂質；C₅₋₂₉の乳酸モノエステル；アルキル、オレフィン-およびアルキルアリール誘導体などのC₈₋₂₀のスルホネート；トリデシルおよびドデシルベンゼンスルホン酸；C₅₋₃₃サルコシンおよびベタイン誘導体を挙げることができる。

両性界面活性剤として、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリンなどのリン脂質を例示することができる。リン脂質は、低HLB界面活性剤や高HLB界面活性剤として用いるのが特に好ましい。

使用しうる非イオン界面活性剤として、エトキシ化ヒマシ油、C₅₋₂₉モノグリセリドおよびそのエトキシ化誘導体；C₁₅₋₆₀ジグリセリドおよびポリオキシエチレン基を1-90有するポリオキシエチレン誘導体；長鎖脂肪酸（脂肪酸部分の炭素数16以上）のC₁₀₋₄₀エステル（アルコール部分の炭素数10-40）；C₁₀₋₄₀アルコール；コレステロール、エルゴステロールなどのステロールとそのC₂₋₂₄エステル；C₈₋₉₆エトキシ化脂肪酸；C₁₄₋₁₃₀の蔗糖脂肪酸エステル；C₂₀₋₁₃₀ソルビトールおよびソルビタンモノエステル、ジエステルおよびトリエステル、およびポリオキシエチレンを0-90有するポリオキシエチレン誘導体（例えばソルビタンモノオレイン酸ポリオキシエチレン、ソルビタンヘキサオレートP.O.E.（50））。低HLB界面活性剤としては、モノーおよびジーグリセリドやこれらの混合物が好ましく、高HLB界面活性剤としてはソルビトールやソルビタン化合物が好ましい。

より詳細には、好ましい低HLB界面活性剤として、C₉₋₁₃のモノグリセリド、C₁₉₋₂₅のモノおよびポリ不飽和脂肪酸のジグリセリド、C₁₅₋₂₈のジグリセリド、C₃₅₋₄₇のモノおよびポリ不飽和脂肪酸のジグリセリドを挙げることができる。また、好ましい高HLB界面活性剤として、エトキシ化ヒマシ油、ソルビタン界面活性剤を挙げることができる。C₁₋₆の短鎖モノヒドロキシアルコールは、毒性の点から本発明の系には界面活性剤として用いない方が望ましい。

本発明のw/oマイクロエマルションに使用する低HLB界面活性剤は、C₉、C₁₀、C₁₁、C₁₂またはC₁₃のモノグリセリドまたはこれらの混合物、好ましくはC₉、C₁₁、C₁₃のモノグリセリドまたはこれらの混合物、より好ましくはC₁

C_{11} および C_{13} のモノグリセリドまたはこれらの混合物を、80重量%以上、好ましくは約90重量%以上、より好ましくは約95重量%以上含むのが好ましい。これらの界面活性剤のうち商業的に入手し得るものとして、 C_{11} モノグリセリドを約80-90重量%含有する H u l s A m e r i c a 社製造の I m w i t o r 308、 C_{11} モノグリセリドを約99重量%含有する 1-モノオクタノイルーラセミーグリセロールである S i g m a C h e m i c a l s 製造のグリセロールモノカプリリン、 C_{13} モノグリセリドを約99重量%含有する 1-モノデカノイルーラセミーグリセロールである S i g m a C h e m i c a l s 製造のグリセロールモノカプラートを挙げることができる。低HLB界面活性剤として、好ましい高純度の C_{9-13} モノグリセリド界面活性剤と他の低HLB界面活性剤と組み合わせができる。あるいは、低HLB界面活性剤を単独で、好ましい高純度の C_{9-13} モノグリセリド界面活性剤またはこれらの混合物に含ませることもできる。

w/oマイクロエマルションに混合する活性物質は水溶性であるのが好ましい。w/oマイクロエマルションの水溶性活性物質は生物学的活性を有し、好ましくは治療的に活性な物質で特に水溶性蛋白、ペプチドなどの薬剤学的に活性な化合物（すなわち薬物や診断薬として用いることができる化合物）である。通常は治療活性とはみなされていないビタミンその他の食品添加剤は、活性物質の定義の中に入らない。有效地に組成され、特に長時間保存するための蛋白として、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼやこれらの誘導体などの酵素や、サイトカイン、ヘモグロビン、インターロイキンなどの高温で保存すると不活性化する不安定な蛋白を挙げができる。混合するのに適したペプチドとしては、カルシトニン、インシュリンなどのポリペプチドホルモンが挙げられる。

w/oマイクロエマルション中に使用することができる他の活性物質として、デスマプレシン (d e s m o p r e s s i n) (1-デスマミノ-8-D-アルギニン バソプレシン)などの薬剤学的に活性なペプチド薬物などの有效地に使用しうるペプチドを挙げができる。使用し得る薬物の例として、

ヘパリンやその誘導体などの抗凝集剤；ペニシリンG、カルベニシリン、メジオ

シリンやその他の弱吸収ペニシリン誘導体などの抗菌剤；セファロチン、セフォキシチン、セフォタキシムや他の通常注射投与されるこの系統の分子などのセファロスボリン；フルオロウラシル、シタラビン、アザウリジン、チオグアニン、ビンプラスチン、ビンクリスチンやブレオマイシンなどの抗腫瘍性薬物；金チオグルコース、金リンゴ酸ナトリウムなどの抗炎症剤；スラミンやメベンダゾールなどの抗寄生虫剤を挙げることができる。

他の活性物質として、RGDペプチド、血液調節ペプチド、バソプレシン、コラーゲナーゼ抑制剤、アンジオテンシン抑制剤、哺乳類成長ホルモン、エリスロポエチン、インターロイキン（例えばIL-2、3、4など）、凝固因子（たとえば因子VII、VIII、IXなど）、コロニー刺激性因子（例えば、G-CSF、CM-CS、M-CSFなど）、視床下部放出ペプチド（例えば、成長ホルモン放出ペプチド、ゴナドトロピン放出因子）、インターフェロン、組織プラスミノーゲン活性化因子、心房性ナトリウムペプチド、腫瘍壞死因子、抗体、抗体フラグメント、凝固因子、ジスマターゼ、ワクチン、免疫調節剤、HIVプロテアーゼ抑制剤、神経親和性因子（例えば、神経成長因子）、ペプチドと蛋白擬似、アンジオテンシンIIアンタゴニストを挙げることができる。

本発明は、約2-約10、より好ましくは約2-約6個のアミノ酸からなる小さなペプチドを含む組成物も提供する。特に、フィブリノーゲンレセプターアンタゴニスト（ペプチド含有RGD）は平均分子量約600のテトラペプチドである。これらのペプチドアンタゴニストは、1pmol/mlの低血漿濃度にて高い血小板凝集抑制作用を示す。好ましいフィブリノーゲンアンタゴニストは、A1iらの発行されたEP出願0341915号の方法により調製されるシクロ(S,S)-N^α-アセチル-Cys-(N^α-メチル)Arg-Gly-Asp-Pen-NH₂である。このEP出願の全文は本明細書の一部として引用する。また、発行されたEPO0423212号（出願番号90311537.6）に記載される方法により調製しうるシクロ(S,S)-(2-メルカプト)ベンゾイル-(N^α-メチル)Arg-Gly-Asp-(2-メルカプト)フェニ

ルアミドも好ましい。このEPO出願の全文は本明細書の一部として引用する。

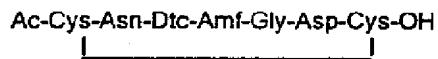
R

GDペプチドは一般に水相の約50mg/ml以下の量でマイクロエマルションに含ませることができる。

本発明において有用なフィブリノーゲンアンタゴニストとして、上記の他にPierschbacherらのWO89/05150(US/88/04403)、MarguerieのEP0275748号、Adamsらの米国特許4,857,508号、Zimmermannらの米国特許第4,683,291号、NuttらのEP0410537号、NuttらのEP0410539号、NuttらのEP0410540号、NuttらのEP0410541号、NuttらのEP0410767号、NuttらのEP0410833号、NuttらのEP0422937号、NuttらのEP0422938号、AiligらのEP0372486号、オオバラのWO90/02751(PCT/JP89/00926に記載されるペプチド、Kleinらの米国特許第4,952,562号、ScarboroughらのWO90/15620(PCT/US90/03417)、1990年11月2日出願のAiliらのUS90/06514、AiligらのEP0381033に開示される化合物に類似のペプチド、AiligらのEP0384362および環状RGDペプチド：



または



本発明でまた有用な大きなペプチド／ポリペプチドは、Pierschbacherらの米国特許第4,589,881号(>30残基)、Bittleらの

米国特許第4,544,500号(20-30残基)、DimarachiらのE

P0204480(>34残基)に開示されるものなどである。

成長ホルモン放出ペプチドもまた有用である。このペプチドは通常12以下のアミノ酸残基からなり、成長ホルモンの放出を誘導する。この成長ホルモン放出ペプチドは水相の約75mg/ml以下の量で使用することができる。

成長ホルモン放出ペプチドの例として、His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂や、本質的に同一機構により成長ホルモンの放出を誘導する他のペプチド：His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂を挙げることができる。他の好ましい成長ペプチドはAla-His-D-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂である。成長ホルモン放出ペプチドは、例えばMomanyの米国特許第4411,890号、Momanyの米国特許第4,410、513号、Momanyの米国特許第4,410、512号、Momanyの米国特許第4,228,158号、Momanyの米国特許第4,228,156号、Momanyの米国特許第4,228,157号、Momanyの米国特許第4,228,155号、Momanyの米国特許第4,226,857号、Momanyの米国特許第4,224,316号、Momanyの米国特許第4,223,021号、Momanyの米国特許第4,223,020号、Momanyの米国特許第4,223,019号、Bowersらの米国特許第4,880,778号、Bowersらの米国特許第4,880,777号、Bowersらの米国特許第4,839,344号、Bowersらの米国特許WO89/10933(PCT/US89/01829)、BowersらのEP出願第398961号、BowersらのEP出願第400051号に記載されている。これらの出願の全文はすべて本明細書の一部として引用する。

本発明は、本明細書で定義する特定の活性物質を必要に応じて患者に効果量投与するさまざまな医用処置法に特に有用である。本明細書に記載される活性物質の用途や疾患については当業者に十分に知られている。治療系投与に要求される活性物質の量は、活性物質を投与する患者、活性物質、患者の特性や症状によっ

て変化する。

本発明で用いられる薬剤学的に活性な物質には、ワクチンアジュvant系に含ませることができる免疫源も含まれる。この免疫源として受容しうるものは、精製した蛋白、ペプチドおよびこれらの混合物であり、重量平均粒径が約150nmであり、このため一般にマイクロエマルションの水相において維持されうる免疫源である。

生物学的に活性な物質は、水溶性物質であると言われている。当業者は代表的な活性物質の一覧表を参照すれば、水相に効果量溶解し有機相には無視しうる程度しか溶解しない化合物であることを容易に理解するであろう。約20°Cにおける活性物質の水相への溶解度は、100,000部あたり約1部以上であり、好ましくは10,000部あたり約1部以上である。この溶解度を達成するために、水相のpHやイオン強度を調節してもよい。マイクロエマルション中の有機相などの有機物質に対する活性物質の溶解度は、約20°Cで1,000,000部あたり約10部未満であり、好ましくは1,000,000部あたり約1部未満である。水：油分配係数は10：1より大きく、50：1より大きいのが有利であり、約100：1より大きいのが好ましく、約1000：1より大きければもっとも好ましい。水：油分配係数は通常用いられている係数であり、物質の約20°Cにおける水への溶解度と油に対する溶解度の比である。油は通常、グリセロールにエステル化した飽和および不飽和脂肪酸のトリグリセリドの混合物である約20°Cのオリーブ油を用いる。分配係数は、等容量の活性物質を水とオリーブ（界面活性剤不存在下）に活性物質を溶解して、各相の溶解度を測定することにより決定する。本明細書で参照した油は、S p e c r t u m C h e m i c a l s M f g 社（カナダのガーデナ）を含む複数の化学会社から入手しうるU.S.P. / N.F. 級オリーブ油である。

内部水相に含まれる活性物質の量は、その溶解度や活性、目的とされる用途、用いるエマルジョンの量などによって大きく変動する。一般に上述のように、活性物質の量が内部水相の容量に基づいて 10^{-9} から100重量%／容量%であれば、ほとんどの適用に対して効果的な組成物になる。生物学的に活性な物質は、

w/oマイクロエマルジョンに溶解しうるものであるのが好ましい。しかし、系

への水の添加によりo/wエマルジョンに反転したときに溶解するものであってもよい。治療のために投与すべき活性物質の量は、投与濃度や用量の反復に基づいて当業者が容易に決定することができるであろう。

w/oマイクロエマルジョンは、ペプチドや蛋白の粘膜吸収促進剤とともに組成することもできる。この中には、トリヒドロキシ胆汁塩などの胆汁塩（すなわち、コール酸塩、タウロコール酸塩、グリココール酸塩）、ジヒドロキシ胆汁塩（すなわち、デオキシコール酸塩、タウロデオキシコール酸塩、ケノデオキシコール酸塩、ウルソデオキシコール酸塩）、デヒドロコール酸塩などのトリケト胆汁塩を挙げることができる。炭素数12-18のアルキル鎖と炭素数2-60のポリオキシエチレン（P O E）鎖を有するポリオキシエチレンエーテル、炭素数2-60のP O Eを有するp-メトキシオクチルフェノキシポリオキシエチレン、炭素数2-60のP O Eを有するノニルフェノキシポリオキシエチレン、炭素数8-24のアルキル鎖と炭素数4-80のP O Eを有するポリオキシエチレンソルビタンエステル、1-ドデシルヘキサヒドロ-2H-アゼピン-2-オン（アゾン、ラウロカプラム）などの非イオン性界面活性剤も用いることができる。ドデシル硫酸ナトリウムやスルホコハク酸ジオクチルナトリウムなどのアニオン界面活性剤も用いることができる。炭素数8-24の飽和脂肪アシル鎖または二重結合を1-4個有する炭素数16-24の不飽和脂肪アシル鎖を有するリゾレシチンも使用することができる。炭素数8-12の飽和脂肪酸を有する中鎖脂肪酸モノノジーエステルや、炭素数16-24の二重結合を1-4個有する不飽和脂肪酸のグリセロールエステルなどのグリセロールのモノノジエステルも使用することができます。アシルカルニチン、アシルコリンやアシルアミノ酸も使用することができます。例えば、炭素数12-20のアシル基を有し、アシル基が0-4の二重結合を有するアシルカルニチン、炭素数8-22で0-4個の二重結合を有する脂肪酸のアシルコリンエステルなどのアシルコリン、N-アシルアミノ酸などのアシルアミノ酸、炭素数8-24で二重結合を0-4個有するジペプチド、 α または β アミノ基を有し分子量が350未満のアミノ酸を例示することができます。

。さらに、炭素数14-24で二重結合を1-4個有するモノおよびポリ不飽和脂

肪酸およびこれらの塩、サリチル酸やそのナトリウム塩、5-メトキシサリチル酸ナトリウムを用いることもできる。

本発明のw/oマイクロエマルションは、所望の比で室温かわずかな高温で特定の化合物を穏やかに攪拌することにより、簡単に混合し容易に調製することができる。上述のように、高エネルギーを要する混合や、加熱は必要ないが、所望によりマイクロエマルション形成速度を速めるために限られたエネルギーを与えたり加熱を行ったりしてもよい。さらに、エマルション形成時に活性物質が水相中に存在するとき以外は特別な順序で成分を添加しなければならないことはない。しかしながら、界面活性剤を最初に油相と混合しておき、適当な比で水を添加するのが好ましい。最初に活性物質を水に溶解し、その後水相を油および界面活性剤に添加するのが好ましい。

調製したw/oマイクロエマルションの滴径、すなわち平均粒径は、通常10-150ナノメーター(nm)であり、普通は50-100nm以下である。滴径の大半は100nm未満であり、より好ましくは75nm未満である。粒径の測定はレーザー光分散技術により通常決定される。w/oマイクロエマルションはまた安定で透明かつ均一な外観を有する点でも特徴的である。

使用時に例えば保存蛋白をw/oエマルションからo/wエマルションに反転するのに必要な水または水性液(たとえば体液)の量は臨界的でなく、過剰の水でマイクロエマルションを滴定することによって機械的に決定することができる。しかしながら概して、エマルション容積の約1-約35倍量の水で初期の目的は十分に達成されることが確認されている。

添加するか体内で供給される水の容量の他に、使用する薬物の放出速度を制御する因子として、pH、温度、攪拌程度などがある。当業者はこれらの条件を通常知られている方法により変更することによって、薬物放出速度を所望により遅くしたり速くしたりすることができる。

本発明のマイクロエマルションは、常温で固体のマイクロエマルションを調製

するために、高融点油（すなわち室温 $22 - 23^{\circ}\text{C}$ より高い融点、好ましくは約 30°C より高い融点を有する油）とともに組成することができる。また、 C_{10-4}

_oの長鎖脂肪酸と炭素数約12以上のアルコールのエステルなどの高融点界面活性剤であって、融点が室温よりも高いもの、好ましくは約 30°C より高いものも使用することができる。マイクロエマルションは体温、一般には約 $35 - 40^{\circ}\text{C}$ で融解するのが好ましい。高融点油の量や融点を変えることができるが、マイクロエマルションを含有する最終組成物は室温で固体である。固体マイクロエマルションは座剤用賦形剤または経口用賦形剤として使用することができる。経口組成物はタブレットまたはカプセルの形になっているのが好ましい。マイクロエマルションは高融点油から直接組成することもできるし、最初に組成してから高融点油をマイクロエマルションと混合することもできる。高融点油は部分水素化やし油、パーム油、カカオバター、水素化ピーナツ油やさまざまな水素化野菜油とこれらの組み合わせなどがよく知られている。好ましい油は、水素化されたやし油、パーム油およびこれらの混合物である。

室温（ $22 - 23^{\circ}\text{C}$ ）で固体のw/oマイクロエマルションは、他の成分とともに調製中に直接高融点油を用いて得ることができる。成分の溶液は、混合中は約 $25 - 60^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは約 $30 - 50^{\circ}\text{C}$ のやや暖かい温度にて加熱し、室温に冷却して固体にする。w/oマイクロエマルションの最終生成物は、液体のマイクロエマルションについて記述した前の記載の範囲内の成分を有する。好ましい固体マイクロエマルションは、融点が約 $85 - 120^{\circ}\text{F}$ の高融点油を約20 - 90%、好ましくは30 - 70 w/w%含有し、水相を約1 - 50%、好ましくは3 - 20 w/w%含有し、HLBが本発明の範囲内である界面活性剤または界面活性剤の混合物を5 - 80%、好ましくは15 - 60%で含有する。好ましくは、界面活性剤は、高HLB界面活性剤（のマイクロエマルション）を2 - 30%、好ましくは5 - 20 w/w%含有し、低HLB界面活性剤（のマイクロエマルション）を4 - 50%、好ましくは10 - 40 w/w%含有する。

室温で固体のw/oマイクロエマルションは、最初にw/oマイクロエマルションを高融点油を用いないで調製し、このマイクロエマルションを高融点油中に

分散することによって調製することもできる。最初に、w/oマイクロエマルションを本発明の方法にしたがって調製する。続いて、高融点油をこのw/oマイ

クロエマルションと混合する。通常は、この操作は約25-60°C、好ましくは約30-50°Cのやや暖かい温度で行う。これによって、マイクロエマルションは高融点油で構成されるマトリックス中に分散する。高融点油の量はマイクロエマルションに対して、約0.5:1から約2:1の範囲内にする。この量は、室温で固体の分散させたマイクロエマルション最終生成物が得られる限りは、この範囲外であってもよい。高融点油は、マイクロエマルションを高融点油中に適切に保持し分散させるために典型的にはマイクロエマルションを添加する前に低いHLB界面活性剤と混合する。

本発明のある種のw/oマイクロエマルションを使用し、そのHLBを効果的な高値に調整することによって、w/oマイクロエマルションは水の添加によりo/wマイクロエマルションに反転する。この反転は特許請求の範囲に記載したw/oマイクロエマルションのすべてがそうであるようにo/wエマルションになるわけではないが、o/wマイクロエマルションに反転するものである。w/oマイクロエマルションのHLB値をマイクロエマルションを破壊することなく通常の安定度以上に高める改質剤を添加することにより、上記の系のHLBは高まる。これらのw/oマイクロエマルションの界面活性剤または界面活性剤の混合物の最終的なHLBは、約7より大きく、好ましくは約7-約16であり、最も好ましくは約8-13である。有用であることが見いだされている改質剤は、マイクロエマルションの水相に混合される。例えば、ソルビトール、ポリエチレングリコール(PEG)、マンニトール、プロピレングリコール、单糖類、二糖類やこれらの混合物を用いることができる。蛋白やペプチドを水相に混合する場合は、マンニトール、ソルビトール、PEGやこれらの混合物を改質剤として使用するのが好ましい。

w/oマイクロエマルションに添加する改質剤が多ければ、w/oマイクロエマルションの反転による系のHLB値上昇程度も大きくなる。このようにHLBが高ければ、o/wマイクロエマルションを保持するように作用する。w/oマ

イクロエマルションに添加する改質剤と高HLB界面活性剤の正確な量は、水の添加による（1）w/oマイクロエマルションの反転、（2）o/wマイクロエマルションの保持の2つの最終結果により機能的に決定される。

w/oマイクロエマルションの水相に添加する改質剤の量は、最終HLBをいかに設定するかに依存する。典型的には、w/oマイクロエマルションの改質水相として、水性改質剤溶液（好ましくはソルビトール溶液）を10-95%、好ましくは20-70%、最も好ましくは20-50重量%使用することができる。このソルビトール溶液は生化学的緩衝液および生理食塩水またはその他の塩を含んでいてもよい。

o/wマイクロエマルションに反転するw/oマンニトールの粒径は、w/oマイクロエマルションについて述べた前の記載と同じである。反転したo/wマイクロエマルションのレーザー光分散技術により測定した平均粒径は、典型的には約100nm未満、好ましくは10-100nm、最も好ましくは20-60nmである。w/o系をo/wマイクロエマルションに反転するのに必要な水の量は、w/oマイクロエマルションの組成によって変わる。必要とされる水の量は、通常w/o系の容積の約1-10倍である。w/o系を反転するときは多めの水を用いることができる、すなわち、w/o系の1000倍まで、好ましくは約3-約100倍の水を用いてo/wマイクロエマルションに反転する。

これらのo/wマイクロエマルション系に反転するw/o系は、油相中では劣化する水溶性薬物（例えば、経口薬または座薬として用いられるある種のペプチド、蛋白、免疫源）の賦形剤として用いると有効である。これらの組成物は、静脈投与か動脈投与するのが好ましい。過剰の体液により反転させて粒径がかなり小さなものができることから、塞栓形成の危険は大幅に軽減されている。

これらのo/wマイクロエマルション系に反転するw/o系は、栄養脂質エマルションやとくに完全非経口栄養組成物として使用することもできる。w/o系は水溶性栄養成分を含む水相を用いて反転させて、投与直前に水中脂質型のマイクロエマルションにすることができる。

生物学的活性物質を本発明の水相中に含むw/oマイクロエマルションは、非

経口投与、腸内投与、その他の粘膜経由（例えば、鼻、直腸、膣）や結腸経由で投与するのが好ましい。投与後に、活性物質による動物への生物学的作用を測定

または観測することができる。反転性マイクロエマルションは、薬物を活性化し、反転部位における取り込みを促進する。本発明のマイクロエマルションの特徴的な反転性により、薬物は油相へ溶解しないため水相中に主として維持されるであろう。油相中に分散するか、エマルションの外の水相中に溶解したときには、ある種の活性物質は不活性化しうる点で、有効である。概して、本発明で使用する蛋白やペプチドのようなこのような活性物質は、 w/o マイクロエマルション中で保存するときの方がエマルション系中に入っていない同一の水相中で同一条件下で同一期間保存したときよりも高活性を示す。

本発明の薬物供給系の w/o マイクロエマルション中に含まれている生物学的活性物質の経口投与は、カプセルまたはタブレットの形で行うことができる。カプセルには、一般に澱粉またはゼラチン材料を用いる。活性物質の中には胃内の低い pH に感応するものもあるので、腸内のより高い pH 領域に導く必要がある。このような活性物質は座薬として投与するのが便利であるが、経口投与が望まれる場合には、カプセルまたはタブレットには腸用コーティングを施すことができる。このようなコーティングは、カプセルまたはタブレット全体のコーティング法として当業者に周知である。本発明の w/o マイクロエマルションを用いた全体がコーティングされたカプセルは以下の工程により製造される。活性剤を含有する w/o マイクロエマルションを調製し、この組成物をカプセル中に導入する。このカプセルを高分子腸用コーティング物質と溶媒からなる腸用コーティング溶液でコーティングする。高分子腸用コーティング物質は、概して薬剤学的に受容される高分子であり、pH 5.5 - 7.0 の腸液と接触して溶解するが、それ以下の pH の胃液には溶解しない。腸用高分子コーティングは商業的に容易に入手することができる。例えば、Eastman Chemical Products 社から入手しうる Eastman™ C-A-P™ (セルロースアセテートフタレート) および C-A-T (セルロースアセテートトリメリテート) 腸用コーティング物質を挙げることができる。高分子を全体にコーティングする方法

としては、スプレーコーティングや浸漬コーティングなどの公知の技術を適用することができ、腸用物質を数層にすることもできる。

上述のように、さらに他の態様では、本発明のマイクロエマルションは、経皮膚剤とは逆に非乾燥局所的軟膏を調製するのに使用してもよい。軟膏は治療活性量のエマルションを既知の局所石油塩基などの皮膚適用用に慣習的に用いられているものであってエマルションと共存しうるものと単に混合することによって容易に調製することができる。例えば炎症している傷の乾燥皮膚表皮層、角質または角質層を除去し、それによって水性ベースの皮膚層をあらわにする傷の治療に、w/o マイクロエマルションが適しているのが理想である。w/o マイクロエマルションは、皮膚層を部分的に除去する際に使用することもできる。w/o マイクロエマルションは皮膚または低い生体層と接触させると水性体液を添加すると o/w エマルションに反転する。皮膚組織の修復や除去を補助するための活性物質として、コラーゲン、エラスタンなどの連結組織蛋白を劣化する、好ましくは、セリン、メタロ、システイン、アスパルチルなどのプロテアーゼを成長因子とともに用いる。成長因子として、血小板由来の成長因子、PDGF、表皮成長因子、EGF、変換成長因子、TGF α および TGF β 、インシュリン様成長因子、IGF-I および IGF-IIなどを挙げることができる。このような活性物質の粒径は 1 - 約 100 nm、好ましくは約 3 - 約 30 nm である。これらの活性物質の分子量は、約 5,000 - 40,000 以上、好ましくは約 5,000 - 約 35,000 である。平均ヒト表皮孔径は約 1 nm 未満であり、このため局所系で用いられる活性物質は表皮層を効果的にトラバースすることはない。

局所用マイクロエマルションは、傷口に安定な蛋白を供給するための貯蔵所 (reservoir) として作用する。局所用マイクロエマルションは、水性液で洗浄することによって傷口から容易に除去しうる固体、軟膏またはゲルとして存在させるのが好ましい。最も好ましいのは、薬物の放出や反転をさせるために傷口で w/o マイクロエマルションを維持するために、固体または半固体（圧力をかけたときに変形するもの）として存在させる場合である。

本発明のさらに別の態様は、w/o マイクロエマルションをワクチンアジュバ

ント系において担体として使用する。このようなワクチンアジュバント系では、免疫源を水相に混合し、この水相を界面活性剤を含む油層で混合する。このよう

なアジュバント系は、ワクチンアジュバントの分野において周知の免疫刺激物とともに調製することができる。このような免疫刺激物として、ムラミルジーまたはトリーペプチドやこれらの誘導体のような化合物、インターフェロン、インターロイキンなどを例示することができる。水相には、免疫源の他に無機塩、緩衝剤、保存剤などが含まれていてもよい。

本発明のマイクロエマルションワクチンアジュバント系は、従来のエマルションアジュバント系に比較して安定性と長期保存性が優れている点に特徴がある。生分解しうる油である本発明の油をマイクロエマルション系を調製するのに使用することは、従来のエマルションアジュバント系統に比べて、肉芽腫形成が少なくなると信じられている点で有利である。 w/o マイクロエマルションアジュバントは、生体内に投与したときにそこでマクロファージ刺激性油滴が生成して、容易に o/w エマルションに反転する。形成される滴の大きさが小さくてより均一であれば、所定の免疫源に対する応答により再現性がでてくると期待される。

本発明の w/o マイクロエマルションは、活性物質の存在したで調製することができる。このような系はさまざまな用途を有するが、基本的には本発明で定義されるような活性物質が含まれる医薬組成物として有用である。

本発明を以下の実施例により説明するが、本発明の範囲を限定する意図はない。

実施例

組成物の調製と反転性

説明として、成分と成分比が反転性のあるマイクロエマルションを提供するような本発明の w/o マイクロエマルション数種を調製した。便宜上、すべての例において薬物は含まれていないが、前に定義した水溶性薬物のいずれをもマイクロエマルションに添加しうることが理解されるであろう。

各組成物を製造するにあたって、以下の一般工程を用いた。

計量した油をピペットで小さいバイアルに入れ、次いで所定のH L B を有する

界面活性剤か界面活性剤の混合物を加えた。バイアルをボルテックスミキサーを用いて界面活性剤と油が均一に混合するまで所定の時間振盪した。生理食塩水を油と界面活性剤の混合物に加え、混合物を光学的に透明なw/oエマルションが

回収されるまで数分間振盪した。定期的に目視することにより曇りや2つの明確な層への分離を確認し、肉眼的に相分離の有無を確認することによって安定性を調べた。ここで安定とは、エマルションが透明で単一層であることを意味する。

粘性、電導度、屈折率などのマイクロエマルションの物理的性質を調べることができる。

実施例1

w/oマイクロエマルションを以下の成分から調製した。

表1

組成物	Captex200	Captex800	Imwitor308	GM ^{a)}	Tween80	水性成分
A	59.4		15.3		15.3	10
B	59.8			15.4	15.4	9.4
C		50	36		8	6

a) モノカプリン酸グリセロール

Captex200 : Karlshamns Lipid Specialties(米国) 製造の、カプロン酸(4.1%)、カプリル酸(68.29%)、カプリン酸(27.4%)、ラウリン酸およびより高次の酸(0.2%)の脂肪酸組成物を含むジカプリル酸/カプリン酸プロピレングリコール

Captex800 : Karlshamns Lipid Specialties(米国) 製造の、ジオクタン酸プロピレングリコール

Imwitor308 : Hulls America社 製造の、カプリル酸グリセロール(80-90% C₁₁モノグリセリド)

モノカプリン酸グリセロール : Sigma Chemical 製造の、1-モノデカノイル-ラセミグリセロール(99% C₁₃モノグリセリド)

Tween80 : Sigma Chemical 製造の、ソルビタンモノオレイン酸ポリオキシエチレン(HLB = 15)

実施例2

本発明のw/oマイクロエマルションの有効性を、カルセインの生物学的利用率と取り込みを検討することにより説明した。実験は、WalkerらのLife Sciences, 47, 29-36, 1990の標準的な意識消失ラットモデル、モデル化合物カルセイン、5(6)-カルボキシフルオレセインを用いて行った。カルセインは蛍光化合物であるため、血液系中の存在が蛍光分光学的に容易に検知しうる。w/oマイクロエマルションは3.0 pmol/kg (1.0 ml/kgマイクロエマルション)で皮膚を通して投与した。実施例1のマイクロエマルションを検討に用いて、生理食塩水中のカルセインを投与した場合と比較した。カルセインの検討結果は表2に示すとおりであった。

表2

マイクロエマルション	カルセイン生物学的利用率 (%)
A	22
B	22.2 ± 6.1
C	22.9 ± 5.3
生理食塩水	1.3 ± 0.5

実施例3

本発明の状態図を作成した。すべての状態図は重量%で示してある。低HLB界面活性剤としてCapte_x200およびImwitor308を含み、高HLB界面活性剤としてTween80を含む油相と、生理食塩水の水相を用いた様々なマイクロエマルションを示す状態図を作成し、図1に示した。

低HLB界面活性剤としてCapte_x8000(トリカブリリン、Karlschamn's)およびImwitor308を含み、高HLB界面活性剤としてTween80を含む油相と、生理食塩水の水相を用いた様々なマイクロエマルションを示す状態図を作成し、図2に示した。

低HLB界面活性剤としてCapte_x200およびImwitor308を含み、高HLB界面活性剤としてGlucamate_{SSE}-20(PEG-20、セスキステアリン酸メチルグルコース、HLB12.5、American)

社)を含む油相と、生理食塩水の水相を用いた様々なマイクロエマルションを示す状態図を作成し、図3に示した。

低HLB界面活性剤としてCapte_x200およびImwitor308を含み、高HLB界面活性剤としてBrrij30(ポリオキシエチレン4ラウリルエーテル、HLB9.7、ICI America)を含む油相と、生理食塩水の水相を用いた様々なマイクロエマルションを示す状態図を作成し、図4に示した。

低HLB界面活性剤としてWhitepsolH-15(グリセロールとラウリル酸のトリエステル:ジエステル=90:10の混合物、融点33-36°C、Huels America)、Capte_x800(ジオクタン酸プロピレングリコール、Karlshamns)およびImwitor308を含み、高HLB界面活性剤としてTween80を含む油相と、生理食塩水の水相を用いた約23°Cで固体の様々なマイクロエマルションを示す状態図を作成し、図5に示した。

実施例4

カルシトニンの生物学的利用率を意識消失ラットモデルを用いて検討した。カルシトニンは、血清中のカルシウム量を下げるにより高カルシウム血症を治療するために用いられる物質である。本実施例では、Capte_x200を45重量%、Imwitor308を25重量%、Tween80を15重量%、塩化ラウロイルを10重量%、サケカルシトニンを含む緩衝液(680i.u.カルシトニン/m1を含む20mM酢酸緩衝液; pH4.5)を5重量%含むマイクロエマルションを用いた。このマイクロエマルションは、界面活性剤を50°Cに加熱して、Capte_x200を混合し、約37°Cに冷却して水相と混合することにより調製した。

5匹の絶食させたラット(オスSprague-Dawley)を腹膜を通してペントバルビタールで麻酔した。首を切開して頸静脈にカテーテルを挿入してカルシウム分析のために血液を採取した。腹腔を切開して十二指腸の表面に巾着縫合を施した。

本実施例で用いたオス幼ラットの体重は、90-160gであった。これらのラットに0.5ml/kg-体重でマイクロエマルションを投与した。マイクロエマルション0.5mlの中には、サケカルシトニンが17i.u.含まれている。

マイクロエマルションを投与後、腹腔のマイクロエマルションが漏れないようシリンジの針を引き出すときに縫糸を締めた。

腹腔は外科用ホチキスで閉じ、ラットは実験時間中麻酔状態におかれた。血液サンプル(50-10μl)を3時間の実験中に定期的に取り出し、血清を調製しB e c k m a n 700カルシウム医療アッセイキットを用いて血清中のカルシウム濃度(遊離イオン化カルシウム濃度)を測定した。血清中のカルシウム濃度をmg/dl単位で表4.1に示した。

表4.1:カルシウムアッセイ結果

時間	血清カルシウム濃度	± SEM (N=5)
~15分	6.8	0.42
15分	7.5	0.54
45分	5.0	0.19
135分	6.2	0.52
165分	6.2	0.56

カルシウム濃度は、マイクロエマルションを皮膚を通して投与した後45分でかなり低下し、少なくとも165分間は投与前よりも低かった。

実施例5

1.2mg/mlの成長ホルモン放出ペプチド(H i s - D - T r p - A l a - T r p - D - P h e - L y s - N H₂; M o m a n y の米国特許第4,411,890号)を含むマイクロエマルションを1ml/kg(動物体重)で直腸へ投与し、ラットモデルにおける生物学的利用率を評価した。

使用したマイクロエマルションは、C a p t e x 2 0 0 を 6 0 重量%、I m w i t o r 3 0 8 を 1 5 重量%、T w e e n 8 0 を 1 5 重量%、ペプチドを含有する生理食塩水を10重量%含有する。

オス Sprague-Dawley 幼ラットの体重は 262 - 343 g であり、投与前に 18 時間絶食させて 2 つの処理グループに分けた。ラットをペントバルビタール（ネンブタール） $60 \text{ mg} / \text{kg}$ - 体重で麻酔し、試験群のラット

に $1 \text{ ml} / \text{kg}$ - 体重のマイクロエマルションを $1.2 \text{ mg GHRP} / \text{ml}$ 濃度で直腸から投与した。対照群のラットには、 $1.2 \text{ mg} / \text{ml}$ の GHRP を含む緩衝液 $1 \text{ ml} / \text{kg}$ を直腸から投与した。頸部カテーテルにより、血液サンプルを採取した。投与前に 0.3 ml のベースライン用血液サンプルを採取し、投与後 1、5、10、15、30、45、60、90 および 120 分にも採取した。血漿中の rGH 濃度を、1 - 25 倍に希釈して Amersham の rGH [^{125}I] アッセイ系を用いて測定した。 $30 \text{ ng} / \text{ml}$ チューブより大きい値はすべて有意な応答とみなした。

試験の結果、15 分で平均ピーク値 $132.39 \text{ ng} / \text{ml}$ チューブに達し、45 分で $23 \text{ ng} / \text{ml}$ に低下した。緩衝液を与えた対照群は 15 分で平均ピーク値 $84 \text{ ng} / \text{ml}$ チューブに達し、60 分で $30.14 \text{ ng} / \text{ml}$ に低下した。血漿中の rGH 濃度の試験結果を、マイクロエマルション投与群については表 5.1、対照群については表 5.2 にそれぞれ示した。

表5.1
マイクロマルショーンを用いた試験群

時間	動物1	動物2	動物3	動物4	動物5	平均	SEM
0	11.39	5.69	5.48		5.51	7.02	1.45
1	19.89	9.16	7.32	4.19	4.89	9.09	2.048
5	106.93	54.41	45.43	33.56	26.68	53.40	14.20
10	214.68	87.94	124.33	74.07	62.23	112.45	27.64
15	167.03	104.00	194.25	93.61	103.06	132.39	20.24
30	60.08	34.98	78.28	86.05	75.75	67.03	9.05
45	15.80	13.30	34.60	28.76	22.78	23.05	3.95
60	9.87	7.48	24.27	7.30	9.82	11.75	3.17
90	6.95	6.90	30.35	7.07	3.61	10.97	4.88
120	8.52	14.66	6.23	3.98	8.02	8.28	1.78

表5.2
緩衝液を用いた対照群

時間	動物1	動物2	動物3	動物4	動物5	平均	SEM
0	23.64		9.86	10.35	10.57	13.60	3.34
1	20.42	10.29	7.50	10.96	11.82	12.20	2.17
5	70.10	10.46	14.19	40.42	39.93	35.02	10.77
10	104.96	10.24	17.35	55.68	69.08	51.46	17.39
15	193.21	11.36	31.02	76.27	110.55	84.48	32.22
30	155.39	10.91	59.33	68.83	74.05	73.70	23.28
45	72.96	17.95	22.20	27.54	50.29	38.19	10.32
60	49.55	12.01	49.65	13.03	26.46	30.14	9.34
90	37.47	6.91	21.31	2.56	10.25	15.70	6.25
120	34.91	<1	13.23	4.23	10.40	15.69	6.67

実施例6

本発明のw/oマイクロエマルションをラットに投与して、シクロ(S, S)-N^ω-アセチル-Cys-(N^ω-メチル)Arg-Gly-Asp-Pen-NH₂などのRGDペプチド供給用の賦形剤としてマイクロエマルションが適當か否かを評価した。

(組成物の調製)

試験に用いたマイクロエマルションは、実施例3に記載したような本明細書の方法によって調製した。

(試験方法)

静脈内投与：絶食させたラットの腹膜を通して注射麻酔し、外科的に頸部カテーテル（ACUCプロトコール#90-151）をとり付けた。ラットを1日外科処置から回復させ、試験前にカテーテルを付けたラットを18時間絶食させた。各ラットにペプチド1mgまたは3mg/kgをラット尾側部静脈に与え、0、1、3、5、10、15、30、45、60、90、120、150、180分後に0.5ml単位で血液サンプルを採取した。0分のサンプルは投与前15分に採取した。サンプルを1600×gで5分間遠心分離することにより血漿を取り出し、得られた各サンプルの血漿250μlアリコートを-20°Cで保存した。血液ペレットを12.5ユニットのヘパリン処理生理食塩水で処理して、適当なラットに頸部カテーテルを通して戻した。試験後にラットに静脈を通してペントバルビタールを投与して安樂死させた。

皮膚投与：絶食させたラットに麻酔カクテルを腹膜を通して投与し、外科的に頸部および十二指腸カテーテルをとり付けた。ラットを4-5日外科処置から回復させた（ACUCプロトコール#91-055）。カテーテルを付けたラットを試験前18-20時間絶食させた。各ラット群に、各マイクロエマルション中ペプチド10mg/kgラット(3.3ml/kg)または各マイクロエマルション中ペプチド6.5mg/kgラット(3.3ml/kg)投与した。ペプチド10mg/kgラット含有する対照生理食塩水を一ラット群に投与した。血液サンプル0.5mlアリコートをヘパリン処理したエペンドルフ管中の頸部カテーテルを通して0、10、30、60、120、180、240、1440分後に採取した。0分のサンプルは投与前15分に十二指腸から採取した。血漿を分析のために集め、血液を静脈投与プロトコールに記載される方法によりラットに戻した。24時間後、ラットに静脈を通してペントバルビタールを投与して安樂死させ、腸管を肉眼により観察した。

ポストカラム HPLC 蛍光アッセイ：サンプルと標品のために、血漿成分を 0.6 ml のアセトニトリルとともに沈殿させ、16,000 × g で 20 分間遠心分離してペレット化した。上澄液を除去して窒素雰囲気下 40°C で乾燥し粉末状にした。この粉末を 0.5 ml の 1% TFA 溶液中に溶解して、固相抽出工程 (SPEP) により処理した。SPEP は、1) メタノールで 1 ml C₁₈ カラムを調節し、1 ml の水でカラムをすすぎ、2) 標品とサンプルをカラムに適用し、1 ml の水で 2 回すすぎ、3) 標品とサンプルをメタノールを用いてカラムから溶出させることによりチューブ中に採取し、0.5 ml アリコートを 2 部得た。サンプルと標品を窒素雰囲気下 40°C で乾燥して粉末状にし、10% メタノール : 90% 超純粋溶液 100 μl に溶解した。標品とサンプルを HPLC バイアルに入れ、標品のバイアルをサンプルのバイアルの HPLC 分析の前後に処理した。ペプチド標準のため、標準濃度に基づいてアリコートを分析のために注入した。すなわち 50 μl のアリコートをポストカラム蛍光検出分析による分析のために注入した。蛍光クロマトグラフィーのデータを集めてネルソンクロマトグラフィーデータシステム (Nelson) を用いて積算した。ピーク面積比 (Y) とペプチド標準濃度 (X) を用いて、以下の式にしたがって原点を通るラインの傾きを算出した：傾き = (XY の和) / (X² の和)。傾きは、サンプルのピーク面積比とペプチド血漿濃度との関係を表している。

(結果)

血漿濃度曲線の面積 (AUC) を各試験群ごとに測定した。生物学的利用率は、静脈投与の平均 AUC から次の式で求められる： [(AUC_{id} / AUC_{iv}) × (mg / kg_{iv} / mg / kg_{id})] × 100。

実施例 7

本発明のマイクロエマルションが、米国特許第 4,703,036 号に記載されている蛋白性物質 (N-メチル-D-フェニルアラニル-L-プロピル-L-アルギニナルカルファート) の生物学的利用率を高めることができるか否かを検討するために本実施例を行った。米国特許第 4,703,036 号は、本明細書の一部としてその全文を引用する。また、上記蛋白性物質は、分子量約 515 の

トリペプチドーアルデヒド誘導体であり (C A S N o . 1 2 6 7 2 1 - 0 7 - 1) 、凝集抵抗活性がある。

本実施例で使用したマイクロエマルションは、Captev 200を60重量%、Imwitor 308を15重量%、Tween 80を15重量%、20 mM酢酸緩衝液を9重量%、ペプチドを0.7重量%、1N塩酸を0.3重量%含む。対象組成物は、生理食塩水中にペプチドを含有する。両組成物ともペプチドを5mg/m1組成物含有する。

オスフィッシャー344ラットをメトキシフルランで麻酔して、中央腹部切開により腸をあらわにし、マイクロエマルションとしてペプチド5m1/kgラットを十二指腸内腔抹消に注入した。注入部位と外科的切開部位は、外科的接着剤により閉じ、ラットを回復させた。血液サンプルを適当な時間に細孔を通してヘパリン処理したバクタイナー (Vacutainer) チューブに採取した。血液から血漿を得て、ペプチドの分析のためにUV検知器を用いてHPLC分析を行った。

マイクロエマルションを投与した3ラットと生理食塩水を投与した3ラットの結果は、マイクロエマルションを用いた方が取り込み量が多くなることを示した。マイクロエマルションの場合の算出曲線面積 (AUC) は2019ng-hr/m1であり、生理食塩水のAUCは534ng-hr/m1であった。算出されたペプチドの生物学的利用率は、マイクロエマルションの場合が40%であり、生理食塩水の場合はわずか10.5%であった。

配列表

(1) 一般情報 :

(i) 出願人 : Albert J. Owen

Seang H. Yiev

Ani B. Sarkahian

(ii) 発明の名称 : 反転性マイクロエマルション組成物

(iii) 配列の数 : 2

(iv) 宛先

(A) 住所 : W o o d c o o c k W a s h b u r n K u r t z M a c k i e
w i c z & N o r r i s

(B) 地区 : O n e L i b r a r y P l a c e - 4 6 F

(C) 市名 : フィラデルフィア

(D) 州名 : P A

(E) 国名 : 米国

(F) 郵便番号 : 1 9 1 0 3

(v) コンピューター読み取り形式 :

(A) 中型 : ディスク, 3.5インチ, 1.44M b 容量

(B) コンピューター : I B M P S / 2

(C) 操作システム : P C - D O S

(D) ソフトウェア : ワードパーカクト 5.0

(vi) 現行出願資料 :

(A) 出願番号 :

(B) 出願日 :

(C) 分類 :

(vii) 先行出願資料

(A) 出願番号 : P C T (現在番号不知)

(B) 出願日 : 1 9 9 2 年 4 月 1 5 日

(viii) 弁理士／代理人情報 :

(A) 氏名 : D a v i d R . B a i l e y , E s q

(B) 登録番号 : 35, 057

(C) 照会／事件整理番号 : A F B I - 0 2 9 5

(ix) 通信情報 :

(A) 電話 : (215) 568-3100

(B) ファクシミリ : (215) 568-3439

(2) 配列番号 1 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：5アミノ酸

(B) 種類：アミノ酸

(D) トポロジー：環状

(ii) 分子型：ペプチド

(ix) 性質：

(A) 名称／キー：修飾部位

(B) 位置：1

(D) 他の情報：／注=N-アセチル-Cys

(ix) 性質：

(A) 名称／キー：ジスルフィド結合

(B) 位置：5

(D) 他の情報：／注=ペニシルアミンアミド

(ix) 性質：

(A) 名称／キー：ジスルフィド結合

(B) 位置：1..5

(ix) 性質：

(A) 名称／キー：修飾部位

(B) 位置：2

(D) 他の情報：／注=アルファ-N-メチル-Arg

(xi) 配列の記述：配列番号1：

Cys	Arg	Gly	Asp	Xaa
1				5

(2) 配列番号2の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：7アミノ酸

(B) 種類：アミノ酸

(D) トポロジー：環状

(ii) 分子型：ペプチド

(ix) 性質：

(A) 名称／キー：修飾部位

(B) 位置：1

(D) 他の情報：／注=N-アセチル-Cys

(ix) 性質：

(A) 名称／キー：ジスルフィド結合

(B) 位置：1..7

(ix) 性質：

(A) 名称／キー：修飾部位

(B) 位置：3

(D) 他の情報：／注="4, 4'-ジメチルチアゾリジン-5-カルボキシサ
イクル酸"

(ix) 性質：

(A) 名称／キー：修飾部位

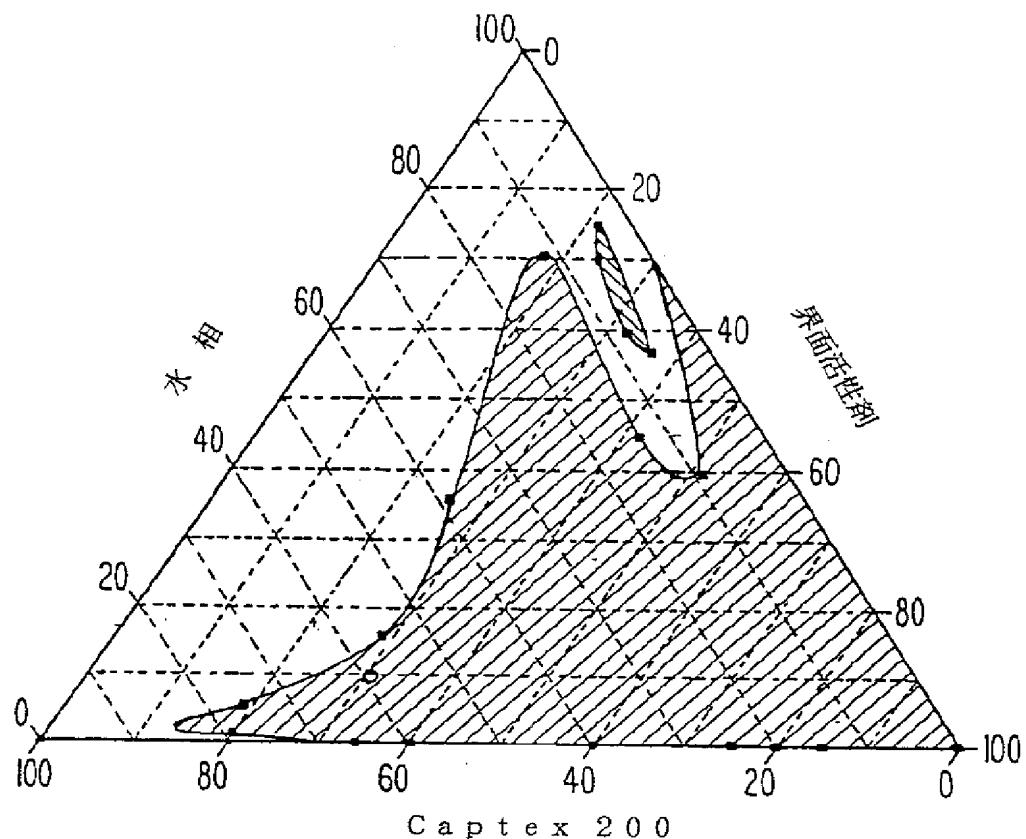
(B) 位置：4

(D) 他の情報：／注="パラーアミノメチルフェニルアラニン"

(xi) 配列の記述：配列番号2：

Cys	Asn	Xaa	Xaa	Gly	Asp	Cys
1				5		

【図1】



1相等方性

1相液晶

○ 92SB8

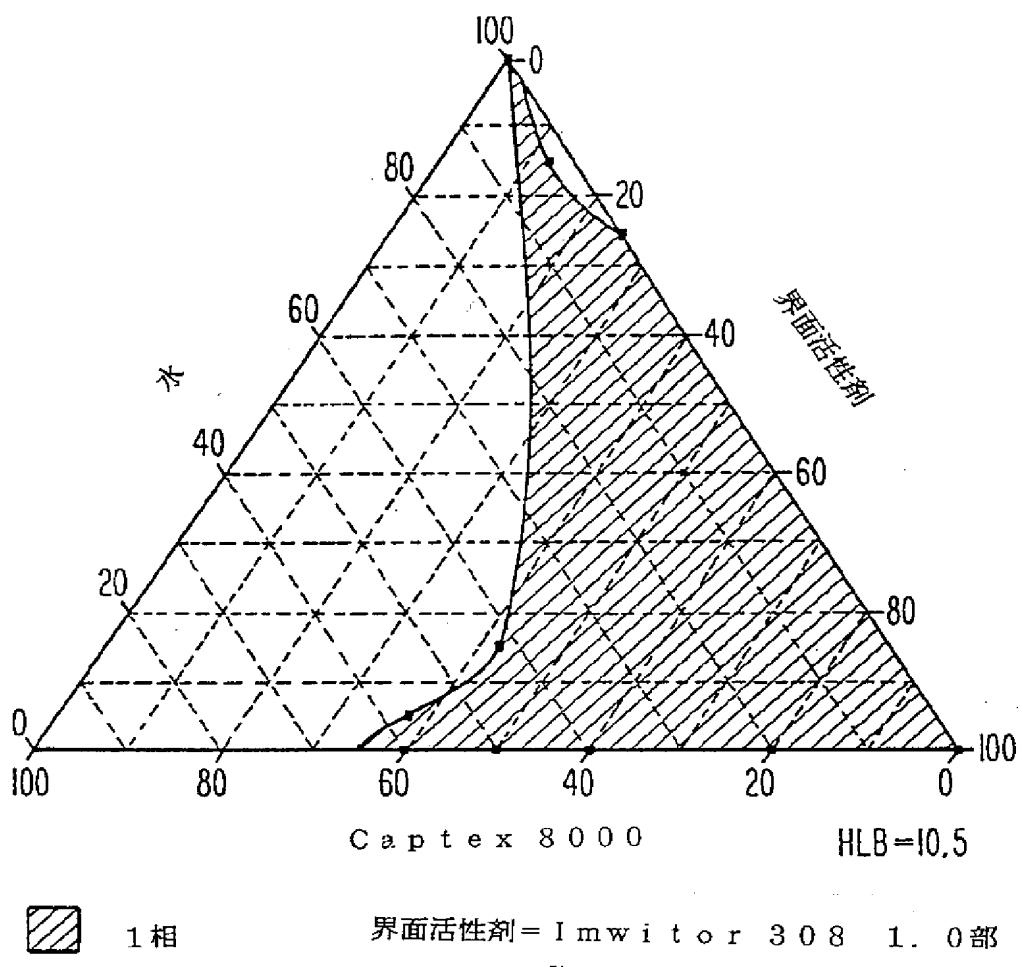
界面活性剤 = I m w i t o r 3 0 8 1. 0 部

T w e e n 8 0 1. 0 部

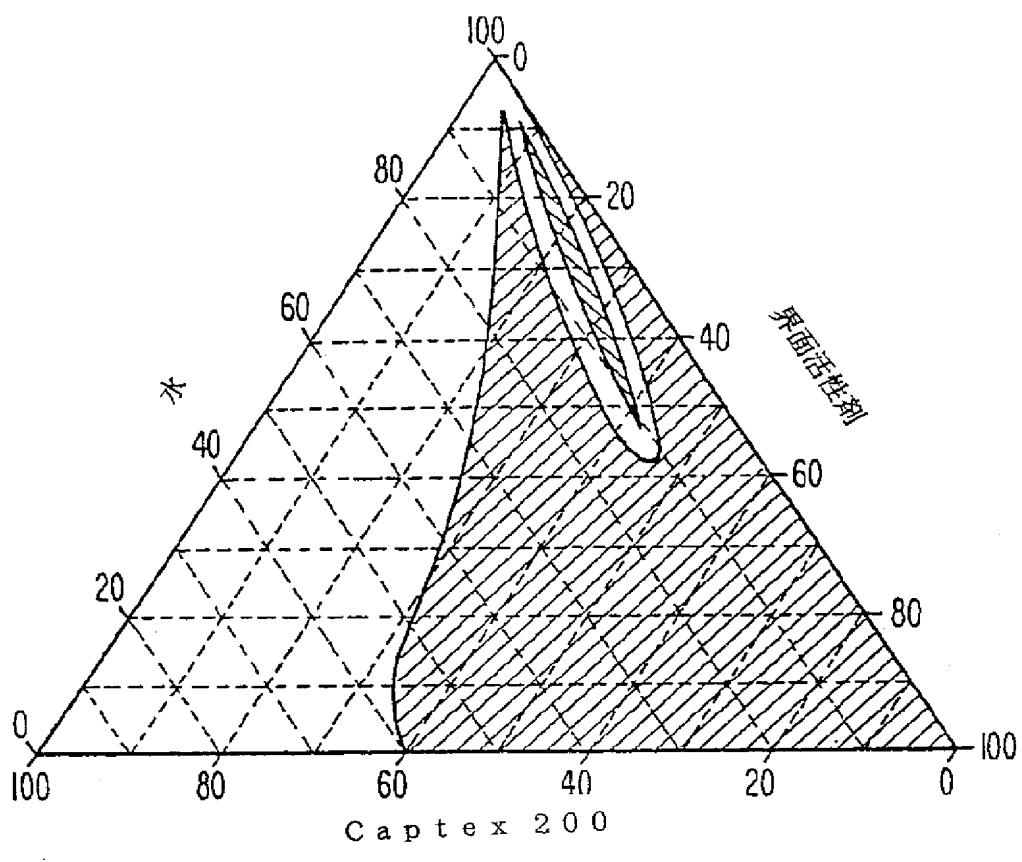
水 相 = 酢酸緩衝液

Fig. 1

【図2】

*Fig. 2*

【図3】

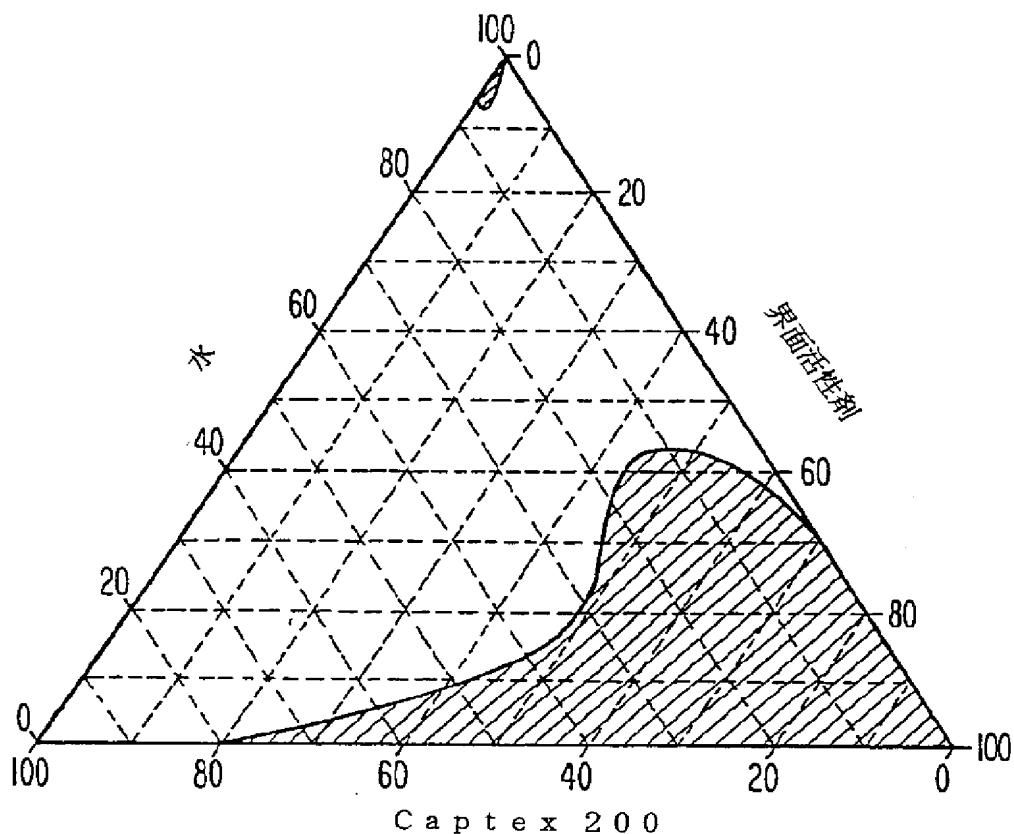


■ 1相ME
■ 1相液晶

界面活性剤 = Imwitor 308 5.0部
Glucamate SSE-20 5.0部

Fig. 3

【図4】

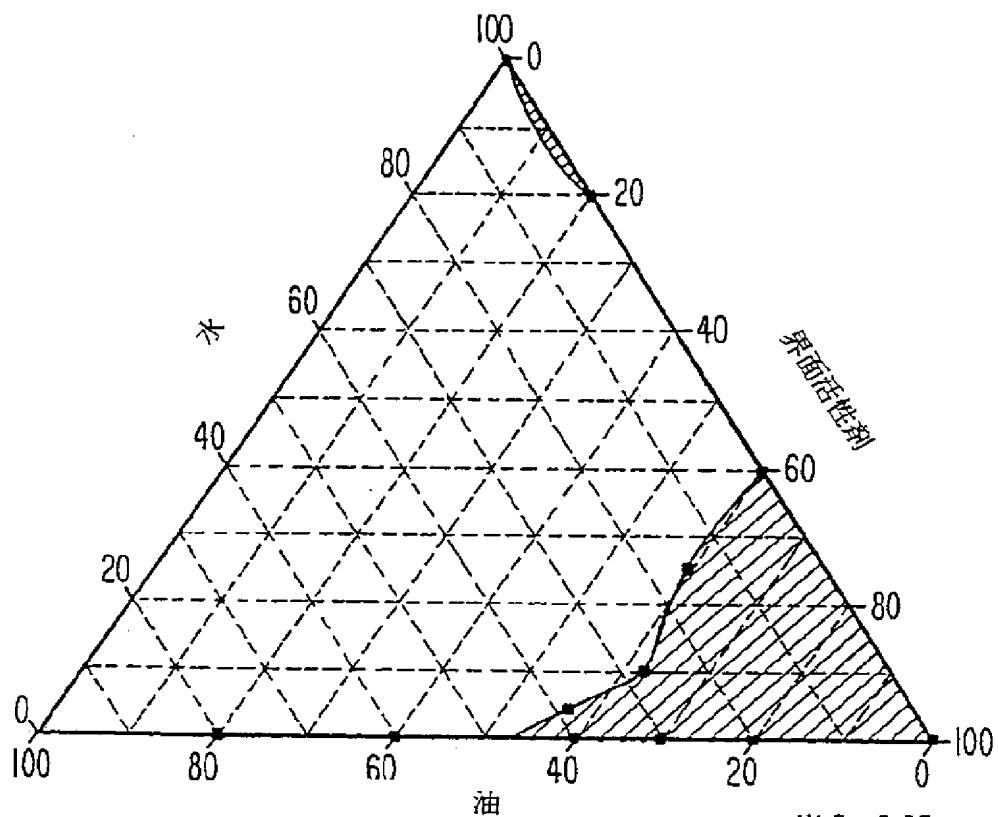


1相

界面活性剤 = Imwitor 308 6. 6部
BRIJ 30 3. 3部

Fig. 4

【図5】



1相

油 = Witepsol H-15 7.5部

Captex 800 2.5部

界面活性剤 = Imwitor 308 7.5部

Tween 80 2.5部

Fig. 5

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1994年10月13日

【補正内容】

補正書の翻訳文

(第45頁－第48頁の差替文の翻訳文)

請求の範囲

1 (訂正) .

(a) 1 以上の薬剤学的に受容しうる油を含む油相、約5－約99容量%

(b) 水を含む水相、約60容量%以下

(c) 水：油の分配係数が10：1より大きい生物学的活性物質

(d) (i) HLBが8未満である低HLB界面活性剤（ここにおいて、当該低HLB界面活性剤は80重量%以上のC₉モノグリセリド、C₁₀モノグリセリド、C₁₁モノグリセリド、C₁₂モノグリセリド、C₁₃モノグリセリドを含む）、および

(ii) HLBが約8より大きい1以上の界面活性剤

を含む混合後のHLBが約7－約14の界面活性剤混合物、約1－約70容量%を含む、保存に適し、生物学的活性材料の投与に適した、安定な油中水マイクロエマルション。

2. 活性物質が治療活性物質であって、蛋白またはペプチドである請求項1の油中水マイクロエマルション。

3 (訂正) . 油中水マイクロエマルションが低HLB界面活性剤を含み、その界面活性剤が、C₉モノグリセリド、C₁₀モノグリセリド、C₁₁モノグリセリド、C₁₂モノグリセリド、C₁₃モノグリセリドおよびこれらの混合物からなる群より選択される界面活性剤を80重量%以上含有する請求項2の油中水マイクロエマルション。

4 (訂正) . 低HLB界面活性剤が前記モノグリセリドを90重量%以上含む請求項3の油中水マイクロエマルション。

5 (訂正) . 低HLB界面活性剤が前記モノグリセリドを95重量%以上含む請求項3の油中水マイクロエマルション。

6. 油相が C₉₋₁₅ トリグリセリド、C₇₋₁₅ のプロピレングリコールのジェステル

およびこれらの混合物を含む請求項 3 の油中水マイクロエマルション。

7 (訂正) . 低 H L B 界面活性剤が 80 重量 % 以上の C₁₁ モノグリセリドを含む請求項 3 の油中水マイクロエマルション。

8. 組成物が約 23 ℃ で固体である請求項 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 および 7 のいずれかの油中水マイクロエマルション。

9. 組成物が約 23 ℃ で液体である請求項 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 および 7 のいずれかの油中水マイクロエマルション。

10 (訂正) . 生物学的活性物質が、 R G D ペプチド、カルシトニン、インシュリン、フィブリノーゲンアンタゴニスト、成長ホルモン放出ペプチド、インターロイキン、エリスロポエチン、コロニー刺激性因子、血液調節ペプチド、バソプレシン、コラーゲナーゼ抑制剤、アンジオテンシン抑制剤、哺乳類成長ホルモン、ヘパリン、凝固因子、組織プラスミノーゲン活性化剤、心房ナトリウム性ペプチドおよび組織壊死因子からなる群より選択される請求項 2 、 3 、 4 、 5 、 6 および 7 のいずれかの油中水マイクロエマルション。

11 (訂正) .

(a) 1 以上の薬剤学的に受容しうる油を含む油相、約 5 - 約 99 容量 %

(b) 水を含む水相、約 60 容量 % 以下

(c) 水 : 油の分配係数が 10 : 1 より大きい治療上有効な蛋白またはペプチドである生物学的活性物質

(d) (i) H L B が 8 未満の低 H L B 界面活性剤 (ここにおいて、当該低 H L B 界面活性剤は 80 重量 % 以上の C₉ モノグリセリド、C₁₀ モノグリセリド、C₁₁ モノグリセリド、C₁₂ モノグリセリド、C₁₃ モノグリセリドを含む) 、および

(ii) H L B が約 8 より大きい 1 以上の界面活性剤

を含む混合後の H L B が約 7 より大きい界面活性剤混合物、約 1 - 約 70 容量 %

(e) 水性液の添加により油中水マイクロエマルションを水中油マイクロエマルジョンに反転するのに十分な量の改質剤

を含む、保存に適し、生物学的活性材料の投与に適した、安定な油中水マイクロエマルション。

1 2 (訂正) . 改質剤がソルビトール、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、マンニトール、二糖類またはこれらの混合物を含む請求項 1 1 の油中水マイクロエマルション。

1 3 (訂正) . 油中水マイクロエマルションが、低 H L B 界面活性剤を含み、その界面活性剤は 8 0 重量 % 以上の C₉モノグリセリド、C₁₀モノグリセリド、C₁₁モノグリセリド、C₁₂モノグリセリド、C₁₃モノグリセリドおよびこれらの混合物からなる群より選択される界面活性剤を含む請求項 2 の油中水マイクロエマルション。

1 4 (訂正) . 組成物が約 2 3 ℃ で固体である請求項 1 1 、 1 2 および 1 3 のいずれかの油中水マイクロエマルション。

1 5 (訂正) . 組成物が約 2 3 ℃ で液体である請求項 1 1 、 1 2 および 1 3 のいずれかの油中水マイクロエマルション。

1 6 (訂正) .

(a) (1) 1 以上 の 薬 剂 学 的 に 受 容 し う る 油 を 含 む 油 相 、 約 5 - 約 9 9 容 量 %

(2) 水 を 含 む 水 相 、 約 6 0 容 量 % 以 下

(3) 水 : 油 の 分 配 係 数 が 1 0 : 1 よ り 大 き い 治 療 活 性 の あ る 生 物 学 的 活 性 物 質

(4) (i) H L B が 8 未 満 で あ る 低 H L B 界 面 活 性 剤 (こ こ に お い て 、 低 H L B 界 面 活 性 剤 は 8 0 重 量 % 以 上 の C₉モ ノ グ リ セ リ ド 、 C₁₀モ ノ グ リ セ リ ド 、 C₁₁モ ノ グ リ セ リ ド 、 C₁₂モ ノ グ リ セ リ ド ま た は C₁₃モ ノ グ リ セ リ ド を 含 む) 、 お よ び

(ii) H L B が 約 8 よ り 大 き い 1 以 上 の 界 面 活 性 剤

を 含 む 混 合 後 の H L B が 約 7 - 約 1 4 の 界 面 活 性 剤 混 合 物 、 約 1 - 約 7 0 容 量 % を 含 む 油 中 水 マ イ ク ロ エ マ ル シ ョ ン を 調 製 し 、

(b) 効 果 量 の 油 中 水 マ イ ク ロ エ マ ル シ ョ ン を 非 経 口 的 、 腸 内 ま た は そ の 他 の 粘

膜 経 由 で 動 物 の 体 に 投 与 し 、

(c) 前記動物の血液系における前記生物学的活性物質の治療効果を増大するこ
とからなる油中水マイクロエマルションを動物に投与する方法。

17(訂正) . 活性物質が蛋白質またはペプチドである請求項17の方法。

18(訂正) . 投与が経口的である請求項18の方法。

19(訂正) . 投与が直腸への投与である請求項18の方法。

20(訂正) . 水性体液を添加する投与工程後に油中水マイクロエマルションを
水中油エマルションに反転することをさらに含む請求項18または19の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/09933

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(S) : A61K 37/00, 37/02, 37/26
US CL : 514/002, 003, 012; 424/088, 400, 094, 003

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 514/002, 003, 012; 424/088, 400, 094, 003

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, CAS ONLINE, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US, 5,045,337 (El-Nokaly et al.) 03 September 1991, see entire document	1-20
A	US, 4,122,158 (Schmitt) 24 October 1978, see entire document	1-20
A	US, 4,460,692 (Tellier et al.) 17 July 1984, see entire document	1-20
A	US, 5,084,289 (Shin et al.) 28 January 1992, see entire document	1-20
A	US, 5,064,653 (Sessions et al.) 12 November 1991, see entire document	1-20

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance
"E"	earlier document published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other reason
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"K"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"a"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 DECEMBER 1993	27 JAN 1994
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. NOT APPLICABLE	Authorized officer CAROL A. SALATA <i>Jill Warden for</i> Telephone No. (703) 308-0196

フロントページの続き

- (72)発明者 イヴ, シャン・エイチ
アメリカ合衆国デラウェア州19802, ウィ
ルミントン, ロックウッド・ロード 800
- (72)発明者 サルカヒアン, アニ・ビー
アメリカ合衆国ペンシルバニア州19010,
ブライン・マウアー, エフ-8, ブライ
ン・マウアー・アベニュー 275